

HYDROGENHALTIGES KOMPOSITMATERIAL, HERGESTELLT DURCH ELEKTRISCH-AUSGELÖSTE  
PRÄZIPITATION EINER FESTPHASE

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Kompositmaterials, ein dadurch hergestelltes Kompositmaterial und dessen Verwendung.

Im medizinischen Bereich werden zunehmend synthetische Gewebeträger als Ersatz für Organe und Gewebe benötigt. Dieses Gebiet wird allgemein als Tissue-Engineering bezeichnet. Von besonderer Bedeutung sind Gewebeträger, die mit dem nativen Organ oder Gewebe in den biologischen, biochemischen, biomechanischen und strukturellen Eigenschaften weitgehend übereinstimmen. Für die rekonstruktive und regenerative Medizin, die Traumatologie und die Orthopädie sind in den letzten Jahren Gewebeträger im muskuloskelettalen Bereich (Ersatz für Knochen, Knorpel und Sehnen) besonders bedeutsam geworden. Die Eigenschaften der zur Zeit verfügbaren Träger entsprechen jedoch in vielerlei Hinsicht nicht dem nativen Gewebe, da häufig die natürliche Morphologie nicht nachgebildet wird und/oder biochemische und/oder biomechanische Eigenschaften nicht übereinstimmen. Für die Reparatur von osteochondralen Defekten stellt Tissue-Engineering einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Dabei werden Zellen mit einem Potential zur Knorpelbildung in poröse Trägermaterialien eingebracht und dann direkt oder nach in vitro-Vorkultivierung in den chondralen Defekt in vivo eingesetzt. Diese Trägermaterialien müssen für ihren Einsatz spezifische Materialeigenschaften, insbesondere Formstabilität, verzögerten Abbau, Biokompatibilität, Zelladhärenz, Chondrokonduktivität, erfüllen. Von besonderer medizinischer und wirtschaftlicher Bedeutung ist das Gebiet der Gelenkserkrankungen. Auf diesem medizinischen Gebiet sind die schmerzhaftesten Krankheiten diejenigen, bei denen Knorpel und die darunter liegende Knochenstruktur zerstört sind. Knorpel hat eine eingeschränkte Fähigkeit zur Regeneration und weist dann in der Regel eine geringere Qualität auf als der gesunde Knorpel. Zahlreiche Versuche sind unternommen worden, gesundes Knorpel- und subchondrales Knochengewebe zu transplantieren oder in Kultur zu halten; jedoch ist bislang auf diesem Wege kein erfolgreicher Ersatz geschaffen worden.

Um synthetische Materialien als erfolgreichen Knorpelersatz verwenden zu können, müssen viele unterschiedliche Eigenschaften des natürlichen Systems berücksichtigt werden. Zu die-

sen Eigenschaften zählen biochemische Zusammensetzung, strukturelle Identität (Nachahmung der zonalen Morphologie) und biomechanische Eigenschaften. Für diese Materialien sind poröse Schäume auf Grundlage von natürlichen und synthetischen Polymeren von unterschiedlichen Autoren vorgeschlagen worden. Ein guter Überblick über die Technologien zur Erzeugung von porösen Materialien für das Tissue-Engineering wird von Mikos et al., *Electronic Journal of Biotechnology*, Vol. 3 No. 2, 2000 dargeboten. Die Autoren beschreiben mehrere Verfahren zur Erzeugung von hochporösen Gitterstrukturen. So werden bspw. Gitterstrukturen durch das Schaffen eines dreidimensionalen Netzwerks von Fasern aus Polyglycolsäure geschaffen. ("Fiber bonding"). Ein anderes Verfahren, um Poren in einer Matrix zu erzeugen, beinhaltet die Verwendung eines wasserlöslichen Porogens, wie etwa eines Salzes. Hierbei wird ein Polymer, Polymilchsäure oder Poly(DL-Milch-Co-Glycolsäure) in Chloroform oder Dichlormethan aufgelöst und dann in eine Petrischale gegossen, die mit dem Porogen gefüllt ist. Hierbei diffundiert das Porogen in die Polymermatrix ein. Nach Verdampfung des Lösungsmittels wird das Komposit aus Polymer/Porogen für 2 Tage in Wasser gelegt, um das Porogen zu entfernen. Die Porosität des resultierenden Gitters kann durch die Menge an zugegebenen Porogen kontrolliert werden, während die Porengröße von der Größe der Porogenteilchen, z.B., wenn das Porogen ein Salz ist, der Salzkristalle, abhängig ist. Ein weiteres Verfahren, das die Verwendung von organischen Lösungsmitteln bei der Porenbildung vermeidet, ist die Verwendung eines Gases als Porogen. Hierbei werden feste Platten eines Polymers formgepreßt und dann unter erhöhtem Druck einem Gas, bspw. CO<sub>2</sub> für einen längeren Zeitraum ausgesetzt. Dabei werden Porositäten von bis zu 93% und Porengrößen bis zu 100 µm erhalten, wobei die Poren jedoch größtenteils nicht miteinander verbunden sind. Zusätzliche Techniken, die für die Herstellung von porösen Polymergittern vorgeschlagen worden sind, beruhen auf dem Konzept der Phasentrennung anstelle des Einbaus eines Porogens. Solche Verfahren beinhalten die Emulgation/Gefriertrocknung oder eine Flüssig-Flüssigphasentrennung. Bei dem ersten Verfahren wird ein Polymer beispielsweise in Dichlormethan aufgelöst und dann wird destilliertes Wasser zugegeben, um eine Emulsion zu bilden. Die Polymer/Wassermischung wird in eine Form gegossen und abgeschreckt durch Einbringen in flüssigen Stickstoff. Nach Abschrecken werden die geschaffenen Gitterstrukturen bei -55°C gefriergetrocknet, was zur Entfernung des dispergierten Wassers und der Polymerlösungsmittel führt. Die Flüssig-Flüssigphasentrennung erzeugt Polymer-reiche und Polymer-arme Phasen innerhalb einer Polymerlösung. Die Polymer-arme Phase wird dann entfernt, was ein hochporöses Polymernetzwerk hinterläßt.

Eine Technik zur Phasentrennung eines Hydrogels wurde von Yannas und Mitarbeitern vorgeschlagen (US 4,955,893). Hierbei wird eine wäßrige Suspension von Collagen-Glycosaminoglycan innerhalb eines Röhrchens axial entlang des Röhrchens eingefroren, wodurch sich Eiskristalle ausbilden können. Anschließend wird das gefrorene Material unter Sublimationsbedingungen einem Vakuum ausgesetzt, wodurch die gebildeten Eiskristalle sublimierten und eine orientierte poröse Kanalstruktur hinterließen, die sich zur anschließenden Besiedelung mit Nervenzellen eignete. Eine ähnliche Technik wird in US 6,447,701 (Heschel et al.) beschrieben, wobei hier die Polymersuspension zwischen 2 Oberflächen mit unterschiedlichen Temperaturen gebracht wird, und wobei die Oberflächen einander gegenüberliegen und aufgrund der unterschiedlichen Temperatur eine im wesentlichen geordnete oder homogene Struktur des Polymernetzwerks und der sich darin ausbildenden Kristalle erzeugt wird.

Keine der bislang im Stand der Technik beschriebenen Technologien hat zur Schaffung eines zufriedenstellenden Trägermaterials geführt, das die Anforderungen an biochemische Zusammensetzung, zonale Morphologie und biomechanische Eigenschaften gleichermaßen erfüllt.

Dementsprechend war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Verfahren bereitzustellen, mit dem sich Kompositmaterialien herstellen lassen, die zum Einsatz als Knochen-/Knorpelersatz geeignet sind, wobei die Kompositmaterialien sowohl eine naturnahe Gewebemorphologie aufweisen, biokompatibel sind, als auch in den biomechanischen und biochemischen Eigenschaften eine hervorragende Übereinstimmung mit nativem Gewebe zeigen.

Außerdem war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein entsprechendes Verfahren bereitzustellen, das einfach durchzuführen ist.

Weiterhin war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Kompositmaterial bereitzustellen, das insbesondere die zonale Morphologie von natürlichem Gewebematerial, insbesondere Knorpel-/Knochengewebe in hervorragender Weise imitiert.

Diese Aufgaben werden gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Kompositmaterials, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Hydrogels, das mindestens einen weiteren Bestandteil umfaßt, der bei Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel ausfällt oder eine feste Phase bildet,
- b) Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel,
- c) Induzieren einer Strukturierung, bevorzugt einer Porenbildung in dem Hydrogel.

In einer Ausführungsform werden die Schritte b) und c) zeitlich zusammen, voreinander oder nacheinander oder so durchgeführt, daß einer der beiden Schritte nach Beginn des jeweiligen anderen Schrittes angefangen wird, ohne daß der andere Schritt bereits abgeschlossen ist.

Bevorzugt wird Schritt c) durch einen Einfrierprozess des Hydrogels und/oder durch Gefrier-trocknung des Hydrogels und/oder durch Elektrolyse von Wasser und/oder durch Elektrolyse von wässrigen Lösungen in dem Hydrogel durchgeführt.

In einer Ausführungsform erfolgt Schritt b) mittels mindestens zweier gegensätzlich gepolter Elektroden.

In einer Ausführungsform bildet in Schritt b) der mindestens eine weitere Bestandteil, der bei Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel ausfällt oder eine feste Phase bildet, eine kristalline und/oder amorphe Phase oder eine Kombination kristalliner und amorpher Phasen.

Bevorzugt wird in Schritt b) eine Spannung von 3 V bis 20 V an das Hydrogel angelegt, und/oder ein Strom der Stärke von 0,5 A bis 5 A fließt durch das Hydrogel, bevorzugt über einen Zeitraum von 0,5 Minuten bis 120 Minuten.

Die Spannung ist eine Gleichspannung oder eine Wechselspannung. In einer Ausführungsform hat die Wechselspannung eine Frequenz im Bereich von 1 Hertz bis 0,01 Hertz.

In einer Ausführungsform ist das Hydrogel ein Hydrogel von einer oder mehreren Verbindungen, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend Kollagen, insbesondere Kollagen vom Typ I und II, Telozeptid-freies Kollagen, Kollagenhydrolysate, Proteoglycane, Glycosaminoglycane, Polymethacrylsäuren, Polymethacrylate, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, Gelatine, Polyglycolsäure, Polymilchsäure und Copolymere von Polymilchsäure und Polyglycolsäure, Glucose, Lipide, Phospholipide, Urate, Hyaluronsäure, Hyaluronsäurederivate, insbesondere

Hyaluronsäureester, sowie ionische Bestandteile ausgewählt aus der Gruppe, umfassend  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ .

In einer Ausführungsform ist der mindestens eine weitere Bestandteil, der bei Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel ausfällt oder eine feste Phase bildet, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend Calciumcarbonate, Calciumphosphate, insbesondere Hydroxylapatit, Tri-Calciumphosphate, Brushit, Octacalciumphosphat, amorphes Calciumphosphat, Tetracalciumphosphat, Monetit, calciumdefizitäres Hydroxylapatit, sowie Verbindungen, gebildet aus ionischen Bestandteilen, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$  sowie ionische Bestandteile.

In einer Ausführungsform umfaßt das Hydrogel einen Bestandteil, der elektrisch leitfähig ist, wobei dieser Bestandteil mit dem mindestens einem weiteren Bestandteil, der bei Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel ausfällt oder eine feste Phase bildet, identisch ist oder von diesem verschieden ist.

Bevorzugt wird der elektrisch leitfähige Bestandteil in das Hydrogel eingebracht oder auf das Hydrogel aufgetragen.

In einer Ausführungsform ist der elektrisch leitfähige Bestandteil chemisch und/oder biologisch inert, wobei bevorzugt ist, daß der elektrisch leitfähige Bestandteil ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend Edelmetalle, insbesondere elementares Gold und/oder Platin, sowie Kohlenstoff, insbesondere Graphit.

Sofern der elektrisch leitfähige Bestandteil in das Hydrogel eingebracht wird, ist bevorzugt, daß er dort homogen oder inhomogen im Hydrogel verteilt wird.

Sofern der elektrisch leitfähige Bestandteil auf einer Oberfläche des Hydrogels aufgetragen wird, ist bevorzugt, daß er durch eine Oberflächenbehandlung strukturiert wird.

In einer Ausführungsform liegt das Hydrogel als eine Schicht vor, die vor oder nach Durchführung des Schrittes b) und/oder c) aufgerollt wird.

Bevorzugt wird das Hydrogel chemisch und/oder physikalisch quervernetzt.



In einer Ausführungsform erfolgt die Gefriertrocknung durch Einfrieren des Hydrogels auf eine Temperatur im Bereich von  $-1^{\circ}\text{C}$  bis  $-196^{\circ}\text{C}$ , bevorzugt im Bereich von  $-10^{\circ}\text{C}$  bis  $-50^{\circ}\text{C}$  und anschließende Sublimation.

In einer Ausführungsform erfolgt das Einfrieren des Hydrogels gerichtet und/oder ungerichtet, bevorzugt von einer und/oder mehreren Seiten des Hydrogels her, wobei bevorzugt wird, daß das Einfrieren des Hydrogels über einen Zeitraum von näherungsweise einer halben Stunde bis vier Stunden erfolgt. Ein Beispiel für ein ungerichtetes Einfrieren ist eine sehr schnelle Erstarrung (Schockgefriervorgang), die zu einem amorphen, glasartigen Zustand des Hydrogels führt.

Die Aufgaben der Erfindung werden auch gelöst durch ein Kompositmaterial, hergestellt durch ein Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung.

In einer Ausführungsform hat das Kompositmaterial der vorliegenden Erfindung eine poren-aufweisende Schicht eines Gels, bevorzugt eines partiell hydratisierten Hydrogels oder eines Xerogels, an die eine feste Phase, bevorzugt eine kristalline und/oder amorphe Phase oder eine Kombination kristalliner und/oder amorpher Phasen angehängt ist, wobei bevorzugt ist, daß die Porengröße im Bereich von  $10\text{ }\mu\text{m}$  –  $150\text{ }\mu\text{m}$  liegt.

Wie hierin verwendet, ist unter " Porengröße" der mittlere Porenkanaldurchmesser zu verstehen.

In einer Ausführungsform ist die feste, bevorzugt kristalline und/oder amorphe Phase oder die Kombination kristalliner und amorpher Phasen ein Calciumphosphat

In einer Ausführungsform umfaßt das Kompositmaterial der vorliegenden Erfindung weiterhin mindestens eine das Zellwachstum oder die Zellansiedlung oder die Zelladhäsion fördernde Substanz, die bevorzugt ein Wachstumsfaktor oder ein fetales Serum oder Poly-L-Lysin ist. In einer Ausführungsform umfaßt das Kompositmaterial Serum, wobei das Serum autogenen, syngen, allogen oder xenogenen Ursprungs ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die mindestens eine das Zellwachstum oder die Zellansiedlung oder die Zelladhäsion fördernde Substanz Serum, wobei das Serum autogenen, syngen, allogen, oder xenogenen Ursprungs ist. Bevorzugter ist der Wachstumsfaktor ausgewählt aus der Gruppe, umfassend Substanzen der TGF- $\beta$ -Superfamilie, insbesondere TGF- $\beta$ 1. In einer Ausführungsform ist das fetale Serum ein tierisches fetales Serum, beispielsweise fetales Kälberserum.

In einer Ausführungsform umfaßt das Kompositmaterial weiterhin biologische Zellen, bevorzugt menschliche oder tierische Zellen.

In einer anderen Ausführungsform umfaßt das Kompositmaterial pflanzliche Zellen.

Die Aufgaben der Erfindung werden auch gelöst durch die Verwendung eines Kompositmaterials gemäß der vorliegenden Erfindung als Träger für biologische Zellen, bevorzugt menschliche oder tierische oder pflanzliche Zellen.

Weiterhin werden die Aufgaben der vorliegenden Erfindung gelöst durch die Verwendung eines Kompositmaterials gemäß der vorliegenden Erfindung als Gewebeersatz im menschlichen oder tierischen Körper.

Weiterhin werden die Aufgaben der Erfindung gelöst durch die Verwendung eines Kompositmaterials gemäß der vorliegenden Erfindung als Trägermaterial für biologisch und/oder chemisch und/oder katalytisch wirksame Substanzen in den Bereichen der Abwasserreinigung, Filtration, Bioreaktortechnik und/oder Katalyse.

Wie hierin verwendet bezeichnet der Begriff "Hydrogel" ein wasserenthaltendes Gel auf der Basis hydrophiler Moleküle, bevorzugt Polymere, die als dreidimensionale Netzwerke vorliegen. In Wasser quellen diese Netzwerke unter weitgehender Formerhaltung bis zu einem Gleichgewichtsvolumen auf. Die Netzwerkbildung erfolgt vorwiegend über chemische Verknüpfung der einzelnen Polymerketten, ist aber auch physikalisch durch elektrostatische, hydrophobe oder Dipol/Dipol-Wechselwirkungen zwischen einzelnen Segmenten der Molekülketten möglich.

Unter "Xerogelen", wie hierin verwendet, sind Gele zu verstehen, die ihre Flüssigkeit auf irgendeine Weise, bspw. durch Verdampfen, Abpressen oder Absaugen, verloren haben, wobei sich auch die räumliche Anordnung des Netzes verändert haben kann, so daß die Abstände zwischen den Strukturelementen andere Dimensionen als in dem Hydrogel haben.

Unter "Gelen" allgemein, wie hierin verwendet, sind formbeständige, leicht deformierbare, an Flüssigkeiten und/oder Gasen reiche disperse Systeme aus mindestens zwei Komponenten zu verstehen, die zumeist aus einem festen, kolloid zerteilten Stoff mit langen oder stark verzweigten Teilchen und einer Flüssigkeit (meist Wasser) als Dispersionsmittel bestehen. In der Regel ist die feste Substanz kohärent, das heißt sie bildet im Dispersionsmittel ein räumliches Netzwerk, wobei die Teilchen durch Neben- oder Hauptvalenzen an verschiedenen Punkten aneinander haften.

Das Anlegen eines elektrischen Feldes an das erfindungsgemäße Hydrogel kann über Elektroden an sich bekannter Bauweise erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden 2 Elektroden verwendet, die einander an gegenüberliegenden Seiten des Hydrogels mit diesem in elektrisch leitender Verbindung in Kontakt treten. Das Verfahren der Gefriertrocknung des Hydrogels ist an sich bekannt und im Stand der Technik beschrieben (e. g. US 4,955,893). Bevorzugt erfolgt der Einfrierschritt des Hydrogels in einer gerichteten Weise, so daß die Ausbildung von Eiskristallen zellular und/oder dendritisch strukturiert erfolgt und/oder auf eine Art erfolgt, die durch die physikalischen Gesetze bei der Erstarrung wasserhaltiger Substanzen vorgegeben ist. Der Einfrierschritt kann jedoch auch ungerichtet erfolgen. Ein Beispiel für ein ungerichtetes Einfrieren ist eine sehr schnelle Erstarrung (Schockgefriervorgang), beispielsweise über einen Zeitraum von 1 s - 180 s, die zu einem amorphen glasartigen Zustand des Hydrogels führt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das Hydrogel mit der sich ausbildenden festen Phase des mindestens einen weiteren Bestandteils kovalent verbunden. Dies kann bspw. über chemische Quervernetzung oder physikalische Quervernetzung erfolgen. Die physikalische Quervernetzung kann durch Bestrahlung (meist kurzwellige Strahlung, wie UV, Gamma, Röntgen) und/oder thermische Behandlung erfolgen. Die Wirkungsweise ist prinzipiell ähnlich wie bei der chemischen Quervernetzung (reaktive chemische Gruppen oder Moleküle die mit anderen Molekülen oder Gruppen chemische Bindungen bilden und so zu einer Stabilisierung der Struktur führen).



In einer bevorzugten Ausführungsform ist der vom Hydrogel umfaßte elektrisch leitfähige Bestandteil biokompatibel.

Es wird nunmehr Bezug genommen auf die Abbildungen, bei denen

Abbildung 1 einen Aufbau zur Erzeugung einer Ausführungsform eines Kompositmaterials gemäß der vorliegenden Erfindung darstellt,

Abbildung 2A eine Ausführungsform eines gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Kompositmaterials zeigt,

Abbildung 2B eine andere Ausführungsform eines gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Kompositmaterials zeigt, welches mit einem zellhistologischen Bild von Knorpel, gefärbt mit Hematoxylin-Eosin, überlagert ist. Der in Abbildung 2B eingesetzte kleinere Rahmen zeigt das Kompositmaterial gemäß der vorliegenden Erfindung, während der größere Rahmen der Abbildung 2B natürlichen Knorpel zeigt. Zellkörper in dem Knorpel sind als dunkle Körperchen, angefärbt mit Hematoxylin-Eosin, zu erkennen. Die Überlagerung der Bilder zeigt die gute Übereinstimmung des erfindungsgemäßen Kompositmaterials mit der natürlichen Struktur gesunden Knorpels.

Die Erfindung wird nunmehr anhand der folgenden Beispiele beschrieben, die zu Erläuterungszwecken dargeboten werden, nicht um die Erfindung zu beschränken.

### Beispiel 1

Der Versuchsaufbau, bestehend aus Peltier-Element und zugehörigem Kühlkörper, sowie zwei Platin-Elektroden und dem Mantel des zylindrischen Probengefäßes, wird steril vorbereitet. Die beiden Platin-Elektroden, von denen eine Elektrode den Boden des Probengefäßes bildet, werden zusammen mit einem PTFE-Rohr, welches den Mantel des zylindrischen Probengefäßes bildet, in einem Druckautoklaven unter Sattedampf-atmosphäre bei 121°C und max. 3 bar Druck für 30 min sterilisiert. Andere in der Medizin übliche Sterilisationsprozesse sind ebenfalls möglich.

Das Peltier-Element, welches als Kühl- und Heizkörper dient, wird durch geeignete Polung an der Oberfläche, die Kontakt zum Probengefäß hat, erwärmt auf 40°C.

5 g Gelatine (Sigma, Typ A aus Schweinehaut) werden bei 50°C in 40 ml einer gesättigten Calciumphosphat Lösung homogen gelöst. 5 ml der Gelatine-Lösung werden anschließend in das sterile Probengefäß der Versuchsanordnung eingefüllt. Nach dem Einfüllen der Gelatine-Lösung wird die obere Platin-Elektrode in die Lösung getaucht.

Anschließend werden folgende Schritte durchgeführt:

- 1a) Durch Umpolung des Peltier-Elements wird eine Temperatur von -30°C an der Oberfläche, die Kontakt zum Probengefäß hat, eingestellt. Gleichzeitig wird eine Spannung von 15 V an den Platin-Elektroden eingestellt, wodurch es zur elektrolytischen Zersetzung des Wassers kommt und Gasblasen aus H<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> entstehen. Außerdem kommt es zur Bildung einer Calciumphosphatschicht an der unteren Elektrode. Sobald eine geschlossene Eisschicht an der Elektrode entsteht, die den Boden des Probengefäßes bildet, hört die Gasentwicklung auf, da kein Stromfluss mehr möglich ist.
- 1b) Anders als in 1a) findet die elektrolytische Zersetzung des Wassers bereits vor Umpolung des Peltier-Elements (und der damit verbundenen Temperaturerniedrigung auf -30°C) statt und endet erst wieder, wenn sich eine geschlossene Eisschicht gebildet hat.

Nach den alternativen Schritten 1a) oder 1b) ist die Lösung nach ca. 2h vollständig gerichtet erstarrt und wird mit einem sterilen Stempel aus dem Mantel des Probengefäßes gedrückt und sofort in einen Gefriertrockner transferiert. Nach 12h Gefriertrocknung wird das getrocknete Hydrogel dem Gefriertrockner entnommen.

- 1c) Das getrocknete Hydrogel wird chemisch in einer aldehyd-haltigen Atmosphäre für 6h vernetzt. Anschließend werden drei Waschungen in steriler 0,9 %iger Kochsalzlösung durchgeführt, um Aldehydreste im getrockneten Hydrogel zu eliminieren.
- 1d) Das getrocknete Hydrogel wird thermisch in trockener Atmosphäre bei 120°C vernetzt.

Ein im Rahmen dieses Beispiels hergestelltes Kompositmaterial kann in den Abbildungen 1, 2A und 2B (kleiner Rahmen) betrachtet werden.

### Beispiel 2

Eigenschaften des erfindungsgemäßen Kompositmaterials aus Beispiel 1.

2a) Die mechanischen Eigenschaften des erfindungsgemäßen Kompositmaterials wurden mit einem speziellen Prüfaufbau getestet.

Die Materialeigenschaften wurden wie folgt ermittelt:

Literatur	Bemerkung	E-Modul [MPa]	Poisson Zahl
Korhonen et al., J. Biomech., 903-909, 2002	(Prüf-Stempel-Ø = 3.7mm) bovine Ex-plantate		
	Femur	$0.47 \pm 0.15$	$0.26 \pm 0.08$
	Humerus	$1.15 \pm 0.43$	$0.16 \pm 0.06$
	Patella	$0.72 \pm 0.19$	$0.21 \pm 0.05$
erfindungs-gemäßes Komposit-material	(Prüf-Stempel-Ø = 8.0mm) erfindungsgemäßes Kompositmaterial	$0.67 \pm 0.02$	0.27

Unter E-Modul ist das Elastizitätsmodul, eine materialspezifische Kenngröße zu verstehen. Es stellt den Proportionalitätsfaktor in dem als Hookschem Gesetz bekannten Zusammenhang dar. Unter der Poisson-Zahl ist die Querkontraktion zu verstehen, sie beschreibt das Verhältnis zwischen Querschnittsänderung und Längenänderung eines Materials.

Die mechanische Prüfung wurde in 0,9%iger Kochsalzlösung durchgeführt. Die mechanischen Eigenschaften des erfindungsgemäßen Kompositmaterials liegen angenähert im Bereich von natürlichem Gewebe.

2b) Die Durchmesser der im erfindungsgemäßen Kompositmaterial gebildeten Porenkanäle wurden durch Auswertung rasterelektronenmikroskopischer Bilder ermittelt. Der ein-

stellbare Porenkanaldurchmesser liegt im Bereich zwischen 10  $\mu\text{m}$  und 150  $\mu\text{m}$  und begünstigt eine einfache Besiedlung der Porenkanäle durch Zellen sowie deren gute Nährstoffversorgung mittels Diffusion. Bei der Zellbesiedlung wird eine Zellsuspension in das erfindungsgemäße Kompositmaterial eingebracht, und die dermaßen angesiedelten Zellen bilden später das sehr dichte natürliche Fasergeflecht, wie es im gesunden Knorpel gefunden wird. Somit ermöglicht das erfindungsgemäße Kompositmaterial die Bildung von natürlichem Knorpel-/Knochengewebe in hervorragender Weise, weist nach Besiedelung eine ähnliche Gewebemorphologie auf, zeigt in den biomechanischen Eigenschaften eine hervorragende Übereinstimmung mit nativem Gewebe und ist biokompatibel.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

### Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Kompositmaterials, umfassend die folgenden Schritte:
  - a) Bereitstellen eines Hydrogels, das mindestens einen weiteren Bestandteil umfaßt, der bei Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel ausfällt oder eine feste Phase bildet,
  - b) Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel,
  - c) Induzieren einer Strukturierung, bevorzugt einer Porenbildung in dem Hydrogel.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Schritte b) und c) zeitlich zusammen, voreinander oder nacheinander oder so durchgeführt werden, daß einer der beiden Schritte nach Beginn des jeweiligen anderen Schrittes angefangen wird, ohne daß der andere Schritt bereits abgeschlossen ist.
3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt c) durch einen Einfrierprozess und/oder durch Gefriertrocknung des Hydrogels und/oder durch Elektrolyse von Wasser und/oder durch Elektrolyse von wässrigen Lösungen in dem Hydrogel durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt b) mittels mindestens zweier gegensätzlich gepolter Elektroden erfolgt.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) der mindestens eine weitere Bestandteil, der bei Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel ausfällt oder eine feste Phase bildet, eine kristalline und/oder amorphe Phase oder eine Kombination kristalliner und amorpher Phasen bildet.
6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) eine Spannung von 3 V bis 20 V an das Hydrogel angelegt und/oder ein Strom der Stärke von 0,5 A bis 5 A durch das Hydrogel fließt, bevorzugt über einen Zeitraum von 0,5 Minuten bis 120 Minuten.

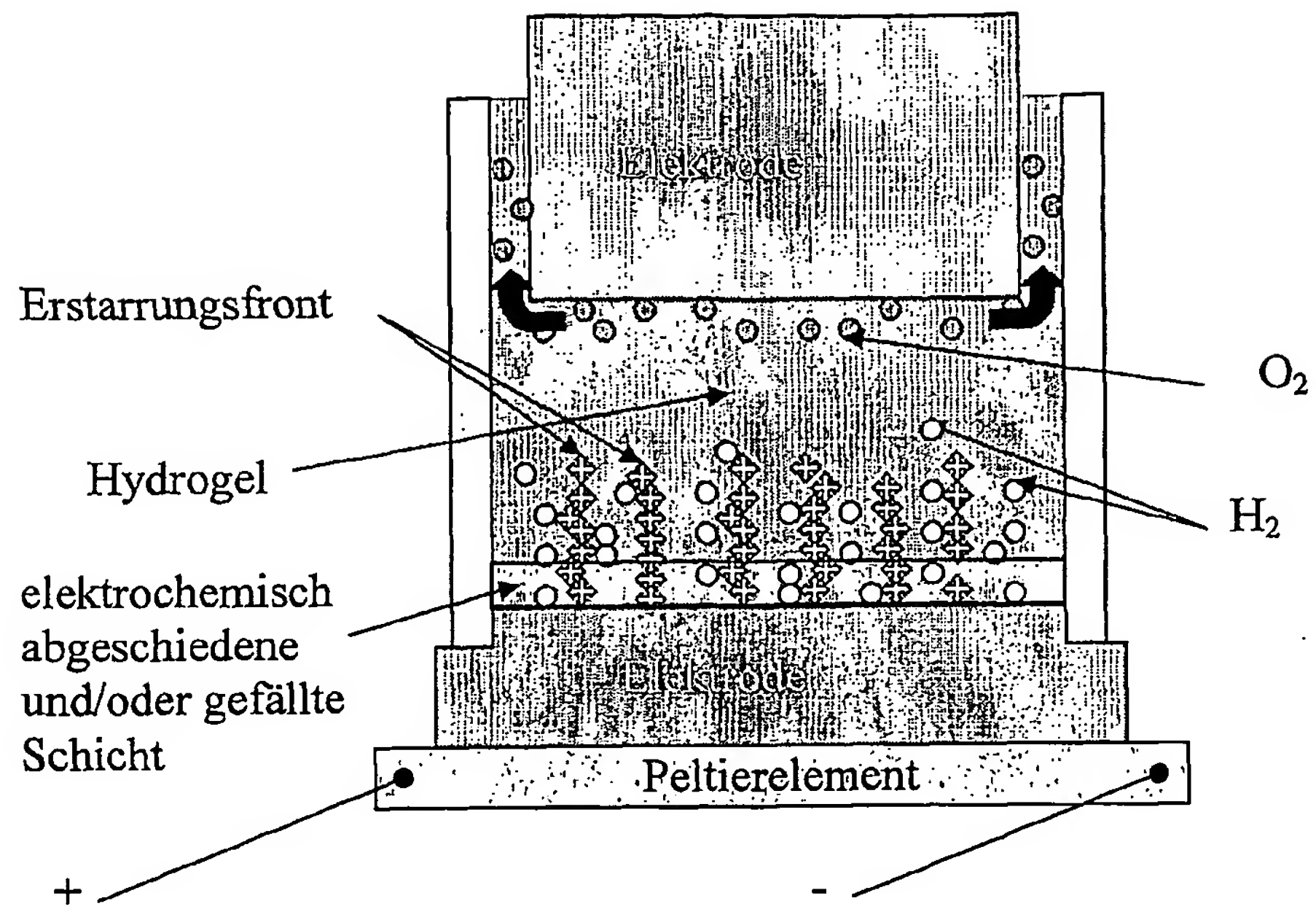


7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die angelegte Spannung eine Gleichspannung oder eine Wechselspannung ist.
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrogel ein Hydrogel von einer oder mehreren Verbindungen ist, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend Kollagen, insbesondere Kollagen vom Typ I und II, Telopeptid-freies Kollagen, Kollagenhydrolysate, Proteoglycane, Glycosaminoglycane, Polymethacrylsäuren, Polymethacrylate, Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, Gelatine, Polyglycolsäure, Polymilchsäure, Copolymere von Polymilchsäure und Polyglycolsäure, Glucose, Lipide, Phospholipide, Urate, Hyaluronsäure, Hyaluronsäurederivate, insbesondere Hyaluronsäureester, sowie ionische Bestandteile, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ .
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der mindestens eine weitere Bestandteil, der bei Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel ausfällt oder eine feste Phase bildet, ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend Calciumcarbonate, Calciumphosphate, insbesondere Hydroxylapatit, Tri-Calciumphosphate, Brushit, Octacalciumphosphat, amorphes Calciumphosphat, Tetracalciumphosphat, Monetit, calciumdefizitäres Hydroxylapatit, sowie Verbindungen gebildet aus ionischen Bestandteilen, ausgewählt aus der Gruppe, umfassend  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ .
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrogel einen Bestandteil umfaßt, der elektrisch leitfähig ist, wobei dieser Bestandteil mit dem mindestens einem weiteren Bestandteil, der bei Anlegen eines elektrischen Feldes an das Hydrogel ausfällt oder eine feste Phase bildet, identisch ist oder von diesem verschieden ist.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der elektrisch leitfähige Bestandteil in das Hydrogel eingebracht wird oder auf das Hydrogel aufgetragen wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 – 11, dadurch gekennzeichnet, daß der elektrisch leitfähige Bestandteil chemisch und/oder biologisch inert ist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der elektrisch leitfähige Bestandteil ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend Edelmetalle, insbesondere elementares Gold und/oder Platin, sowie Kohlenstoff, insbesondere Graphit.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 – 13, dadurch gekennzeichnet, daß, sofern der elektrisch leitfähige Bestandteil in das Hydrogel eingebracht wird, er dort homogen oder inhomogen im Hydrogel verteilt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 – 13, dadurch gekennzeichnet, daß, sofern der elektrisch leitfähige Bestandteil auf einer Oberfläche des Hydrogels aufgetragen wird, er durch eine Oberflächenbehandlung strukturiert wird.
16. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrogel als eine Schicht vorliegt, die vor oder nach Durchführung des Schrittes b) und/oder c) aufgerollt wird.
17. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Hydrogel chemisch und/oder physikalisch quervernetzt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 – 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Gefriertrocknung durch Einfrieren des Hydrogels auf eine Temperatur im Bereich von  $-1^{\circ}\text{C}$  bis  $-196^{\circ}\text{C}$  und anschließende Sublimation erfolgt.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Einfrieren des Hydrogels gerichtet und/oder ungerichtet, bevorzugt von einer und/oder mehreren Seiten des Hydrogels her erfolgt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 – 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Einfrieren des Hydrogels über einen Zeitraum von näherungsweise einer halben Stunde bis vier Stunden erfolgt.
21. Kompositmaterial hergestellt durch ein Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche.

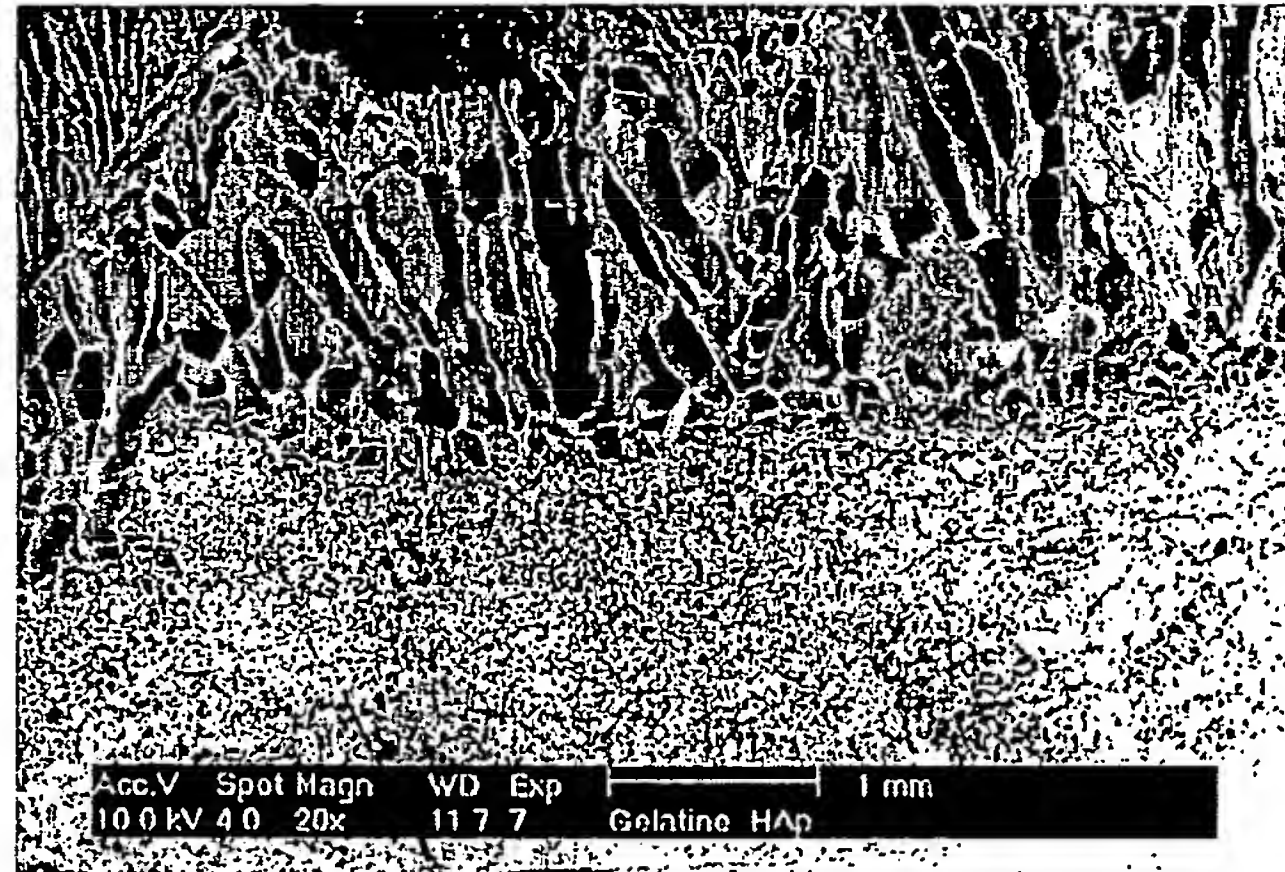
22. Kompositmaterial nach Anspruch 21, gekennzeichnet durch eine porenauweisende Schicht eines Gels, bevorzugt eines partiell hydratisierten Hydrogels oder eines Xerogels, an die eine feste Phase, bevorzugt eine kristalline und/oder amorphe Phase oder eine Kombination kristalliner und amorpher Phasen angehängt ist.
23. Kompositmaterial nach einem der Ansprüche 21 – 22, gekennzeichnet durch eine Porengröße von 10  $\mu\text{m}$  – 150  $\mu\text{m}$ .
24. Kompositmaterial nach einem der Ansprüche 21 – 23, dadurch gekennzeichnet, daß die feste, bevorzugt kristalline und/oder amorphe Phase oder die Kombination kristalliner und amorpher Phasen ein Calciumphosphat ist.
25. Kompositmaterial nach einem der Ansprüche 21 – 24, weiterhin umfassend mindestens eine das Zellwachstum oder die Zellansiedlung oder die Zelladhäsion fördernde Substanz.
26. Kompositmaterial nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine das Zellwachstum oder die Zellansiedlung oder die Zelladhäsion fördernde Substanz ein Wachstumsfaktor oder ein fetales Serum oder Poly-L-Lysin ist, wobei der Wachstumsfaktor bevorzugt ausgewählt ist aus der Gruppe, umfassend Substanzen der TGF- $\beta$ -Superfamilie, insbesondere TGF- $\beta$ 1, und wobei das fetale Serum ein tierisches fetales Serum, beispielsweise fetales Kälberserum ist.
27. Kompositmaterial nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die mindestens eine das Zellwachstum oder die Zellansiedlung oder die Zelladhäsion fördernde Substanz Serum ist, wobei das Serum autogenen, syngeneten, allogenen oder xenogenen Ursprungs ist.
28. Kompositmaterial nach einem der Ansprüche 21 – 27, dadurch gekennzeichnet, daß es weiterhin biologische Zellen, bevorzugt menschliche oder tierische Zellen oder pflanzliche Zellen umfaßt.
29. Verwendung eines Kompositmaterials nach einem der Ansprüche 21 – 28 als Träger für biologische Zellen, bevorzugt menschliche oder tierische Zellen oder pflanzliche Zellen.

30. Verwendung eines Kompositmaterials nach einem der Ansprüche 21 – 28, als Gewebeersatz im menschlichen oder tierischen Körper.
31. Verwendung eines Kompositmaterials nach einem der Ansprüche 21 – 28 als Trägermaterial für biologisch und/oder katalytisch und/oder chemisch wirksame Substanzen in den Bereichen der Abwasserreinigung, Filtration, Bioreaktortechnik und/oder Katalyse.

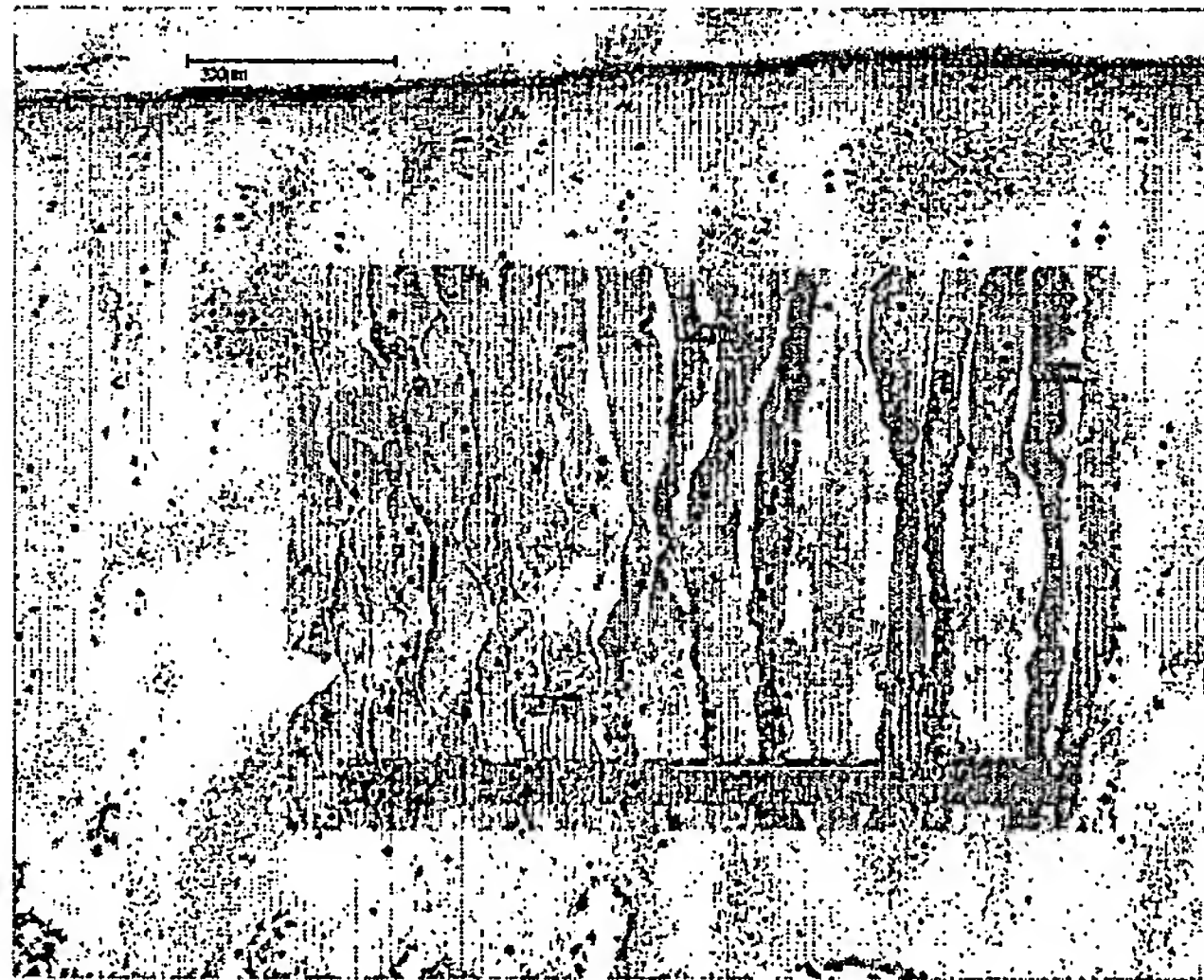
**Abbildung 1**



**A**



**B**



**Abbildung 2**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/012564

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61L27/46 A61L27/52 A61L27/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/022319 A (ISIS INNOVATION LIMITED; CZERNUSZKA, JAN, TADEUSZ; SACHLOS, ELEFThERIO) 20 March 2003 (2003-03-20) pages 1,3,9,10 page 11	1-31
A	US 3 892 649 A (PHILLIPS ET AL) 1 July 1975 (1975-07-01) column 1, line 3 - line 9 column 1, line 27 - line 34 column 2, line 9 - line 68	1-31
A	US 6 417 247 B1 (ARMSTRONG BETH L ET AL) 9 July 2002 (2002-07-09) column 3, line 37 - line 56 column 5, line 16 - line 32	1-31
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 2005

Date of mailing of the international search report

09/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hars, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/012564

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KREKLAU B ET AL: "Tissue engineering of biphasic joint cartilage transplants" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 20, no. 18, September 1999 (1999-09), pages 1743-1749, XP002228282 ISSN: 0142-9612 abstract -----	1-31
A	WO 03/089022 A (UNIVERSITY OF FLORIDA; GOWER, LAURIE, B; OLSZTA, MATTHEW, J; DOUGLAS,) 30 October 2003 (2003-10-30) paragraphs '0009!, '0010!, '0013!, '0049!, '0057!, '0061! -----	1-31
A	MIKOS ANTONIOS G ET AL: "Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering" EJB ELECTRONIC JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 3, no. 2 CITED SEPT. 6, 2000, 15 August 2000 (2000-08-15), pages 1-12 URL, XP001205451 ISSN: 0717-3458 the whole document -----	1-31
P,A	ZEHBE ET AL.: "Oriented Collagen-Based/Hydroxyapatite Matrices for Articular Cartilage Replacement" KEY ENGINEERING MATERIALS, vol. 254-256, 7 November 2003 (2003-11-07), pages 1083-1086, XP009044597 SWITZERLAND page 1085 -----	1-31

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/EP2004/012564**

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although claim 30 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/012564

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 03022319	A	20-03-2003	EP	1427455 A1	16-06-2004
			WO	03022319 A1	20-03-2003
			US	2004258729 A1	23-12-2004
US 3892649	A	01-07-1975	NONE		
US 6417247	B1	09-07-2002	WO	9919003 A1	22-04-1999
WO 03089022	A	30-10-2003	AU	2003228587 A1	03-11-2003
			WO	03089022 A1	30-10-2003
			US	2003232071 A1	18-12-2003
			US	2004131562 A1	08-07-2004